

**Untersuchungen zur Bestimmung
intrathrombozytärer Enzymaktivitäten
im thrombozytenreichen Plasma**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Frigga Rimpel

1973

Mainz
1972

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. H.D. Wolff

Untersuchungen zur Bestimmung
intrathrombozytärer Enzymaktivitäten
im thrombozytenreichen Plasma

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
FRIGGA R I M P E L
aus
Magdeburg
Mainz 1972

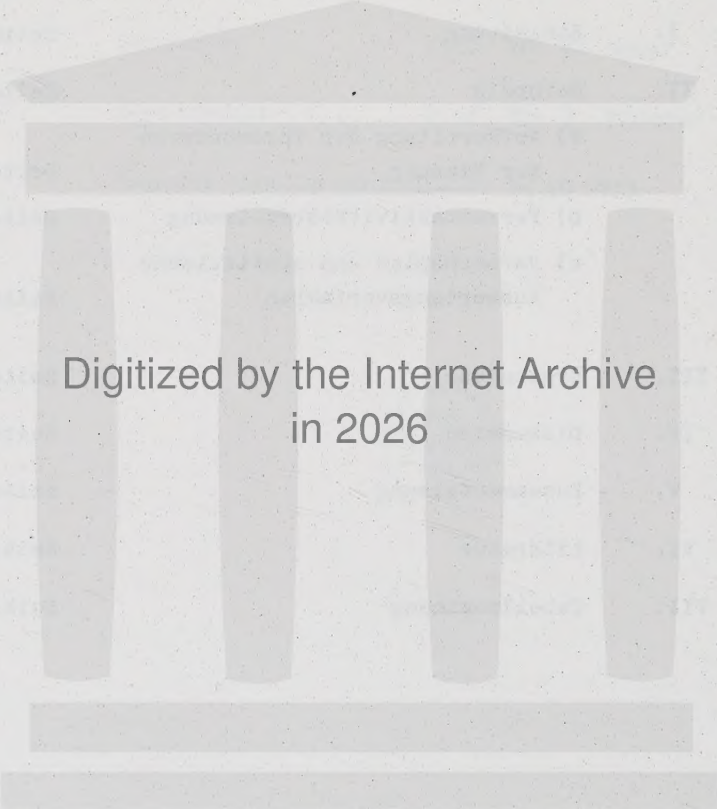
Dekan: Prof. Dr. A. Mayet
Referent: Prof. Dr. W. Ohler
Korreferent: Prof. Dr. J. Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.1973



I n h a l t s a n g a b e

I.	Einleitung	Seite	1
II.	Methodik	Seite	3
	a) Aufbereitung der Thrombozyten zur Messung	Seite	3
	b) Fermentaktivitätsbestimmung	Seite	4
	c) Versuchsplan und statistische Auswertungsverfahren	Seite	5
III.	Ergebnisse	Seite	7
IV.	Diskussion	Seite	10
V.	Zusammenfassung	Seite	17
VI.	Literatur	Seite	19
VII.	Tabellenanhang	Seite	21



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung:

Die Erforschung des Thrombozytenstoffwechsels und die Bestimmung intrathrombozytärer Fermente (18) haben wesentlich dazu beigetragen, neue Erkenntnisse über die Pathophysiologie verschiedener thrombozytogener Gerinnungsstörungen, insbesondere der Thrombasthenie G L A N Z M A N N und der enzymopathischen thrombozytopenischen Purpura zu gewinnen. W A L L E R u. G R O S S (16)

Bei diesen Erkrankungen konnte ein Mangel bestimmter Fermente des Kohlenhydratstoffwechsels, z.B. eine Verminderung der Glycerinaldehyd- β -Phosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase bei der Thrombasthenie, nachgewiesen werden. L Ü H R, W A L L E R u. G R O S S (8)

Die Bedeutung dieser Enzymdefekte liegt einerseits in der Klärung pathophysiologischer Zusammenhänge zwischen Thrombozytenfunktion und Thrombozytenstoffwechsel und andererseits in der Möglichkeit, durch die intrathrombozytären Enzymbestimmungen diese Erkrankungen diagnostisch zu erkennen. Somit stellt die Bestimmung der intrathrombozytären Fermente neben anderen gerinnungsanalytischen Untersuchungen ein wertvolles diagnostisches Verfahren zur Erfassung der oben angeführten haemorrhagischen Diathesen dar. Die Bestimmung der einzelnen Fermente wird allerdings durch einige Faktoren erschwert.

Hier ist zunächst die mechanische Vulnerabilität der Thrombozyten zu nennen, durch die eine Beeinträchtigung der Fermentaktivitäten hervorgerufen werden kann. Weiter beeinflusst die Streubreite der heute bekannten Thrombozytenzählverfahren die Untersuchung.

Um die Vulnerabilität der Thrombozyten durch mechanische Manipulationen möglichst gering zu halten und dadurch einen Störfaktor auszuschalten, wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Enzymbestimmungen das Plasmasubstraktionsverfahren nach O H L E R (11) angewandt. Dabei sollen durch Bestimmung von vier intrathrombozytären Enzymen der Laktatdehydrogenase (L D H), der Pyruvatkinase (P K), der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (G A P D H), der 3-Phosphoglycerat-Kinase (P G K) an einem größeren gesunden Personengut weitere Daten über die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode gewonnen werden.

Methodik:a) Aufbereitung der Thrombozyten zur Messung:

27 ml Venenblut wurde in paraffinierten Spritzen unter Vorlage von 3,0 ml einer 3,8 %igen Natriumzitratlösung vorsichtig entnommen und gemischt. Das Zitratblut wurde sofort über 5 Minuten bei 800 bis 1000 Umdrehungen zentrifugiert und das überstehende thrombozytenreiche Plasma abgehebert. Durch wiederholte, niedertourige Zentrifugation dieses plättchenreichen Plasmas konnten mögliche kleine Erythrozyten- und Leukozytenbeimengungen entfernt werden.

1 : 10 Z i t r a t b l u t

Thrombozytenreiches Plasma	Restblut
(1-4x) 5 Min. 1000 T	15 Min. 3 500 T
Gereinigtes thrombozytenreiches Plasma	Zellarmes Plasma
	15 Min. 3 500 T
	Zellfreies Plasma
<u>Testansatz zur Thrombozytolys</u>	<u>Testansatz als Plasmakontrolle</u>

Abb.1 : Schematische Darstellung des Vorgehens zur Herstellung des thrombozytenreichen Plasmas (11)

Als Bezugssystem der Enzymaktivitäten wurde, wie von WALLER et alii (18) die Thrombozytenzahl (10^{11} Thrombozyten) gewählt.

Die Zählung der Thrombozyten im plättchenreichem Plasma erfolgte nach der direkten Zählmethode nach LUDIN-FEISSLY (6)

Beide so gewonnenen Plasmen wurden in Parallelansätzen zur Messung der Enzymaktivitäten in folgender Weise vorbereitet:

4,0 ml Plasma
 2,0 ml bidestilliertes Wasser
 1,4 ml Triäthanolaminpuffer, pH = 7,5
 0,6 ml gesättigte Digitoninlösung

Diese Testansätze verblieben dann zur Zytolyse eine Stunde im Kühlschrank bei + 4 Grad Celsius. Danach wurden durch Zentrifugation mit 4000 T über 10 Minuten das Thrombozytenstroma und die ungelösten Digitoninreste entfernt. Die beiden Plasmaverdünnungen gelangten als "Thrombolysat" und "Kontrollansatz" zur Messung.

b) Fermentaktivitätsbestimmungen:

Die Enzymaktivitäten wurden photometrisch mit dem Gerät "Eppendorf" bei 366 mμ Wellenlänge in einem auf 25 Grad temperierten Küvettenhalter und einem pH-Wert von 7,5 gemessen. Es wurde jeweils nach einem Vorlauf "im fliegenden Start" Extinktionsänderungen von 0,050 abgestoppt. Nachfolgend sind die einzelnen Enzymtestverfahren genannt:

- 1) 3-Phosphoglycerat-Kinase (P G K)
(VOGELL und Mitarbeiter, 1959 (15))
- 2) Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) :
(DELBRÜCK, ZEBE und BÜCHER , 1959 (5))
- 3) Laktatdehydrogenase (L D H)
(KUBOWITZ und OTT, 1943 (5))
- 4) PYRUVATKINASE (P K) (BEISENHERZ und Mitarbeiter,
1953 (2))

Die Ermittlung der Enzymaktivitäten erfolgte nach der bei O H L E R (11) aufgeführten Berechnung.

c) Versuchsplan und statistische Auswertungsverfahren:

Die Frage der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Enzymaktivitätswerte mit der beschriebenen Methode wurde

- 1) durch einen Untersuchervergleich an der gleichen Stichprobe
- 2) durch die Prüfung der Zeitkonstanz der Werte
über mehrere Tage und
- 3) durch den Vergleich der Nüchtern- und Postprandialwerte untersucht.
- 4) Durch Stichprobenvergleich mit den Ergebnissen einer früheren Untersuchung. (Siehe Diskussion).

Die Mittelwertsdifferenzen der von den zwei Untersuchern am gleichen Kollektiv ermittelten Enzymwerte, sowie die Unterschiede zwischen den nüchtern und postprandial erhobenen

Messungen wurden mit dem t-Test für verbundene Stichproben auf Signifikanz getestet. (E. Weber (19)). *

Dabei wird ein Wert als signifikant angesehen, wenn die Prüfgröße den bei der vorliegenden Zahl von Freiheitsgraden für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,01$ angegebenen Wert erreicht oder überschreitet, und als statistisch auffällig, wenn die Prüfgröße gleich oder größer ausfällt als der bei $p = 0,05$ angegebene Wert.

Um zugleich die interindividuellen Unterschiede der Enzymaktivitäten bei den einzelnen Versuchspersonen und die intraindividuellen Schwankungen jedes Probanden über die verschiedenen Tage zu ermitteln, wurde für jedes Enzym eine doppelte Varianzanalyse mit den Faktoren Versuchspersonen und Tage durchgeführt. (E. Weber (19)).

Dabei wurden die Varianzen beider Einflußgrößen, d.h. die Unterschiede zwischen den Personen und die zwischen den Tagen, an der verbleibenden Restvarianz auf Signifikanz getestet.

Für die berechnete Prüfgröße F wurden die gleichen Signifikanzgrenzen zugrunde gelegt wie für den t-Test. Der Stichprobenvergleich erfolgte mit Hilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben, wobei dieselbe Signifikanzgrenze zugrunde gelegt wurde wie bei dem t-Test für verbundene Stichproben.

* Für die freundliche und hilfreiche Beratung und Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung der Meßdaten danke ich Frau Dr. Netter vom Institut für Statistik und Dokumentation der Universität Mainz (Direktor: Prof. Dr. Koller)

3) E r g e b n i s s e :

Nach der oben aufgeführten Methode wurden folgende vier Thrombozytenfermente bei 31 gesunden Probanden männlichen und weiblichen Geschlechts bestimmt:

1. Die L a c t a t d e h y d r o g e n a s e (LDH)
2. Die P y r u v a t k i n a s e (PK)
3. Die 3- P h o s p h o g l y c e r a t - K i n a s e (PGK)
4. Die G l y c e r i n a l d e h y d - 3 - P h o s p h a t -
D e h y d r o g e n a s e (GAPDH)

Die Mittelwerte der an der Gesamtgruppe von $n = 31$ Personen berechneten einzelnen Enzymaktivitäten sind in der Tabelle 1 aufgeführt. (Einzeldaten dafür siehe Tabelle 4 im Anhang) Dabei war die LDH mit $169 \text{ IE}/10^{11}$ Thrombozyten das Enzym mit der höchsten und die PGK mit $115 \text{ IE}/10^{11}$ Thrombozyten das Enzym mit der niedrigsten Aktivität.

	Mittelwerte ($\bar{x}$)	Standardab- weichung (s)	s.d.Mittel- werte ($s \bar{x}$)
L D H	169,48	23,6	4.23881
P K	139,54	22,0	3.95753
P G K	115,06	14,9	2.68567
G A P D H	131,51	26,8	4.81818

Tabelle 1. Mittelwerte der Enzymaktivitäten der vier gewählten intrathrombozytären Fermente in $\text{IE}/10^{11}$ Thrombozyten.

Ferner wurden die vier intrathrombozytären Fermente von zwei verschiedenen Untersuchern bei fünf gesunden Personen gemessen. Die beiden Untersucher führten die Messung der intrathrombozytären Enzymaktivitäten an einer Person jeweils am gleichen Tage durch. Nach dem t-Test für verbundene Stichproben bestanden keine signifikanten Unterschiede. (s.Tabelle 2).

Enzym	Unter- sucher	Versuchspersonen					$\bar{x}$ diff	$s_{\bar{x}}$ diff	t	p
		1	2	3	4	5				
LDH	I	181	162	162	152	175	0,20	1,869	0,128	>0,05
	II	183	164	166	148	172				
PK	I	121	130	125	137,5	164	2,90	2,365	1,159	>0,05
	II	115	128	130	136	154				
PGK	I	129	98	111	97	113	2,40	2,535	0,835	>0,05
	II	116	96	115	95	114				
GAPDH	I	155	118	125	118	135	1,50	2,369	0,599	>0,05
	II	144	116	126	119,5	138				

Tabelle 2: Bestimmung der Thrombozytenfermente von zwei verschiedenen Untersuchern bei fünf Probanden.

I = Untersucher : Leonhardt

II = Untersucher : Franke

Um weitere Daten für die Zuverlässigkeit der Methode zu gewinnen, wurden bei den gleichen Personen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen Wiederholungsmessungen der intrathrombozytären Fermente durchgeführt. Diese Bestimmungen wurden bei 14 Personen an drei aufeinanderfolgenden Tagen (s.Tab.5) und bei 7 weiteren Personen an vier aufeinanderfolgenden Tagen (s.Tab.6 und Abb.1-4) durchgeführt.

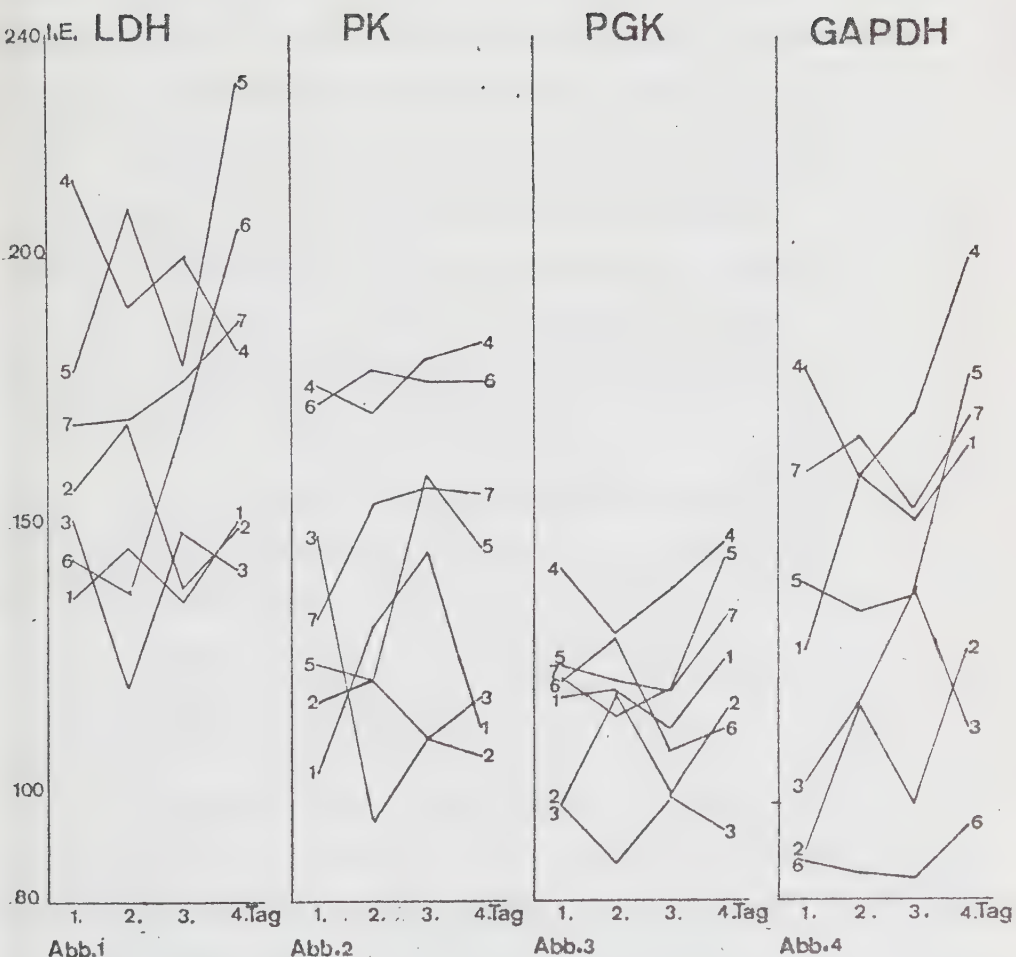


Abb. 1-4 Graphische Darstellung der Meßergebnisse der Aktivitäten von 4 Fermenten bei 7 Personen gemessen an vier aufeinanderfolgenden Tagen.

Bei der Varianzanalyse stellte sich heraus, daß signifikante Unterschiede zwischen der Absoluthöhe der intrathrombozytären Fermentaktivitäten bei den einzelnen Individuen bestehen, daß sich aber die Fermentaktivitäten des einzelnen an drei aufeinanderfolgenden Tagen im wesentlichen nicht signifikant unterscheiden. (s. Varianzanalysen Tab. 1.) Jedoch ergaben sich für die PK bei den Bestimmungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen und für die GAPDH bei den Bestimmungen an vier aufeinanderfolgenden Tagen statistisch auffällige Unterschiede zwischen den einzelnen Tagen. Um festzustellen, ob die Nahrungsaufnahme einen Einfluß auf die Absoluthöhe der Fermentaktivitäten hat, wurden die Fermentaktivitäten bei 5 Personen nüchtern und postprandial bestimmt. Dabei ergab sich bei der GAPDH im t-Test ein statistisch auffälliger Unterschied zwischen den Nüchtern- und Postprandialwerten, während die anderen Enzyme keine statistische signifikanten Differenzen zeigten. (s. Tab. 3).

Enzym	Untersuchung	Versuchspersonen					$\bar{x}_{diff}$	$s_{\bar{x}_{diff}}$	t	p
		1	2	3	4	5				
LDH	I	142	199	145	194	167	5,80	3,060	1,385	>0,05
	II	147	202	145	193	189				
PK	I	127	196	127	163	156	0,80	2,324	0,331	>0,05
	II	127	198	119	159	168				
PGK	I	108	135	110	128	113	0,00	2,646	0,000	>0,05
	II	108	142	103	121	120				
GAPDH	I	137	189	141	176	150	4,60	1,994	2,588	<0,05
	II	130	185	135	168	152				

Tabelle 3 : Untersuchung des Einflusses der Nahrungsaufnahme auf die intrathrombozytären Enzymaktivitäten bei 5 Probanden.

I = nüchtern

II = nicht nüchtern

4) D i s k u s s i o n :

Intrathrombozytäre Enzymbestimmungen haben seit den grundlegenden Untersuchungen von W A L L E R et alii (18) in der Diagnostik haemorrhagischer Diathesen eine größere Bedeutung erlangt.

So kann durch den Nachweis eines intrathrombozytären Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase- und Pyruvatkinasemangels eine Form der Thrombasthenie GLANZMANN "biochemisch definiert" werden (B L U M (3)). Bei den oftmals mit Thrombozytopenien einhergehenden intraerythrozytären Enzymdefekten (Glutathionreduktasemangel (LÖHR und WALLER (9)), Glukose-6-Phosphatdehydrogenasemangel (RAMOT und Mitarbeiter (14)) ließ sich der gleiche Fermentdefekt auch in den Thrombozyten nachweisen, was zur Zusammenfassung dieser Thrombozytopenien in die Gruppe der "enzymopathischen thrombozytopenischen Purpura" führte (Übersichten bei LÖHR (10), OHLER (12)).

Die zu Beginn der vorgelegten Arbeit angedeuteten technischen Schwierigkeiten bei der Bestimmung intrathrombozytärer Enzyme bedingten jedoch immer noch die Tatsache, daß die Enzymuntersuchungen in Thrombozyten auf eine kleinere Gruppe spezieller Laboratorien beschränkt blieb. Die methodischen

Probleme begründen auch unterschiedliche Ergebnisse in der Absoluthöhe der gemessenen intrathrombozytären Enzymaktivitäten der verschiedenen Arbeitsgruppen. Während andere Autoren (WALLER (17), BEESE (1)) intrathrombozytäre Enzymbestimmungen an isolierten und gewaschenen Thrombozyten vornehmen, versuchte OHLER (11) die Fermentmessungen an im Plasma belassenen Thrombozyten durchzuführen ("Plasmasubstraktionsverfahren"). Der Vorteil der Methode liegt in einer verminderten methodisch bedingten Traumatisierung der Blutplättchen, für die das Plasma das "physiologische Milieu" darstellt. Der nachteilige Einfluß der Isolierung und Aufschwemmung der Thrombozyten in verschiedenen Plasmaersatzmedien wurde u.a. von BREDDIN (4) und Mitarbeitern zur Frage der optimalen Aufbereitung von Thrombozyten zu Transfusionsmedien bewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, weitere Daten über mögliche Einflußgrößen bei der Anwendung des Plasmasubstraktionsverfahrens zu gewinnen. Im einzelnen wurden geprüft: a) der Einfluß der Nahrungsaufnahme auf die Höhe der Enzymaktivitäten in den Thrombozyten und b) die Reproduzierbarkeit der Werte durch Ermittlung der Enzymaktivitäten durch zwei verschiedene Untersucher und c) die Reproduzierbarkeit der Meßwerte an verschiedenen Tagen bei den gleichen Probanden.

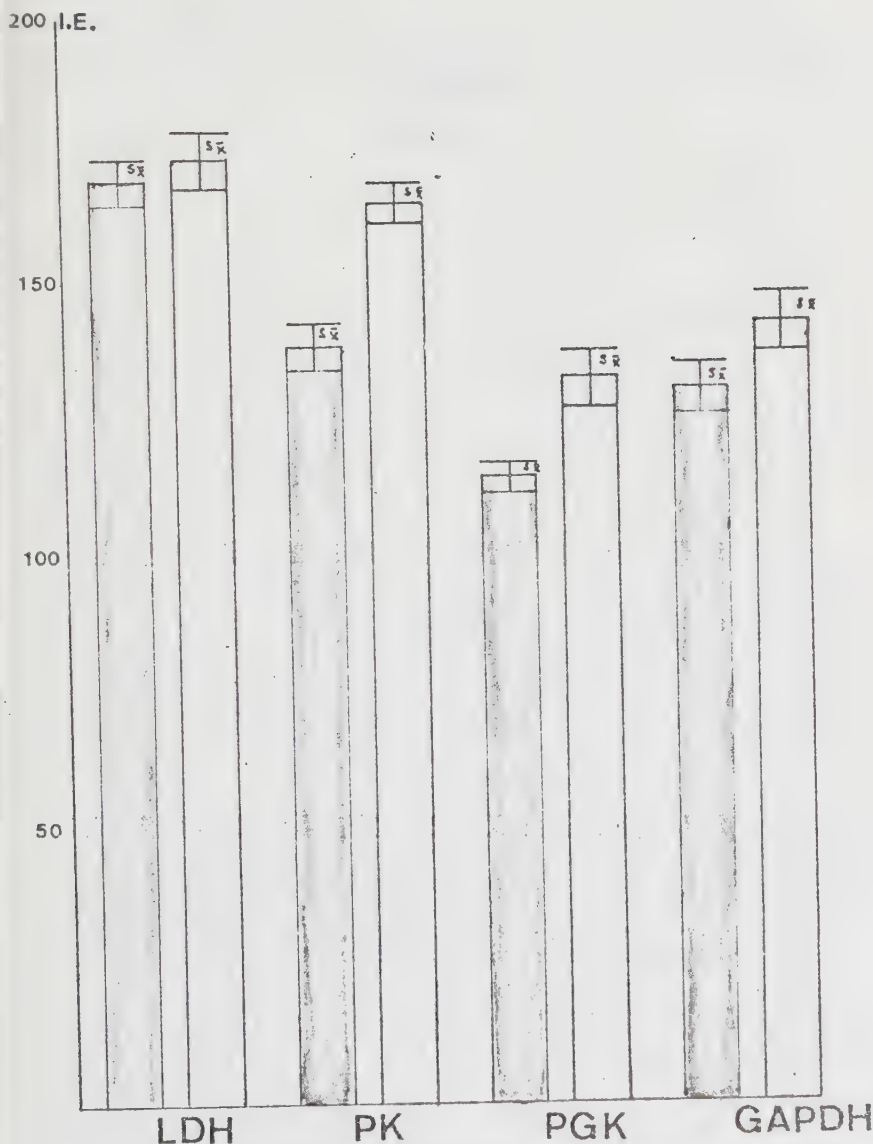


Abb.5 Graphisch dargestellter Vergleich zwischen den Mittelwerten der Aktivitäten der LDH, PK, PGK und GAPDH in Thrombozyten von OHLER (weiß; n=15) und den eigenen gemessenen Werten (grau; n=31); $s_{\bar{x}}$ = Standardabweichung der Mittelwerte.

Die erhaltenen Untersuchungsergebnisse bestätigen im wesentlichen die mit dem Plasmasubstrationsverfahren von OHLER (11) gewonnenen Resultate: Die absolute Höhe der Enzymaktivitäten in Thrombozyten, erhalten an einem größeren Probandenkollektiv und gemessen mit dem genannten Verfahren, liegen höher als die aus der Literatur bekannten Werte an isolierten Thrombozyten. (LÖHR (10)).

Sie entsprechen jedoch im Enzymspektrum in ihren Relationen zueinander den früheren Meßwerten.

Im Vergleich zu den früheren Untersuchungsergebnissen von OHLER (11) konnten jedoch folgende Abweichungen gefunden werden: Die Fermentaktivitäten lagen bei dem vorgelegten größeren Probandengut für die PK und PCK signifikant niedriger

($t = 4,17$ resp. $3,47 > t_{0,01; 44}$) während die Mittelwerte für die LDH und GAPDH sich nicht

über zufällig unterschieden ($t = 0,64$ resp. $1,60 < t_{0,05; 44}$). Die Abbildung 5 gibt hierüber graphischen Aufschluß. Diese Abweichungen sind weder geschlechtsspezifisch bedingt, noch konnte ein jahreszeitlicher Einfluß auf die Untersuchungsergebnisse nachgewiesen werden. (s.dazu Tab. 7 und Abb.6 im Tabellenanhang).

OHLER		Leonhardt	
Mittelwerte ($\bar{x}$)	Standardab- weichung der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$)	Mittelwerte ($\bar{x}$)	Standardab- weichung der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$)
PK männl. 163,66 IE	3,80	141,27 IE	5,29
PK weibl. 169,66 IE	10,68	137,15 IE	6,13
PGK männl. 131,91 IE	5,52	110,44 IE	3,40
PGK weibl. 136,66 IE	13,87	121,46 IE	3,79

Tab.7 Vergleich der Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmungen bei männlichen und weiblichen Probanden von 2 Untersuchern (OHLER, Leonhardt).

Die Bestimmung der intrathrombozytären Enzymaktivitäten bei nüchternen Probanden und nach den Mahlzeiten zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die Differenzen der beiden so gewonnenen Werte lagen unter 1 Prozent.

Somit darf die Feststellung getroffen werden, daß die Höhe der intrathrombozytären Enzyme nicht auffällig durch die Nahrungsaufnahme verändert wird. Für die Praxis bedeutet dies, daß die intrathrombozytären Fermente nicht unbedingt am nüchternen

Patienten bestimmt werden müssen. Allerdings ist es für die Auftrennung des thrombozytenreichen Plasmas vom zellfreien Plasma vorteilhaft, das Plasma frei von Trübungen zu haben. Dies erleichtert die direkte Beobachtung, daß nach dem optischen Eindruck das zellfreie Plasma frei von Bestandteilen ist und damit die enzymatische Bestimmung nicht stört.

Die Messung intrathrombozytärer Enzyme durch zwei verschiedene Untersucher zeigt, daß die Werte praktisch absolut reproduzierbar waren. Daraus kann gefolgert werden, daß die Differenzen, die zwischen einzelnen Untersuchern auftreten, insbesondere durch die Manipulationen bei der Herstellung thrombozytenreichen Plasmas bzw. der Isolierung der Thrombozyten hervorgerufen werden. Dies kann etwa durch Nichteinhaltung der vorgeschriebenen Zentrifugationsvorgänge bedingt sein, so daß sich qualitative Unterschiede in der Thrombozytenausbeute ergeben: Größere, voluminösere Thrombozyten werden dann eher abzentrifugiert und gehen mit ihrem Enzymgehalt nicht mehr in die Messung ein. Dieser Nachteil trifft sowohl für das Plasmasubstraktionsverfahren als auch für die durch Waschungen isolierten Thrombozyten zu, da beide Verfahren auf der Abtrennung der Thrombozyten durch Differentialzentrifugation beruhen. Daher wird die Genauigkeit der intrathrombozytären Enzymbestimmungen in erster Linie durch die sorgfältigen stets konstant zu haltenden Auftrennungsmethoden bestimmt. In diesem Zusammenhang sei noch auf die bisher nicht näher überprüfte Einflußnahme der

Thrombozytenzählbestimmung hingewiesen, die als Bezugsgröße der intrathrombozytären Enzymbestimmungen ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Absoluthöhe der Ergebnisse ist.

Es ist gut vorstellbar, die Genauigkeit des Plasmasubstraktionsverfahrens dadurch zu steigern, daß die Abtrennung des zellfreien Plasmas erst aus dem gereinigten thrombozytenreichen Plasma erfolgt. Hierdurch kann wohl vermieden werden, daß bei der Abtrennung des thrombozytenreichen Plasmas möglicherweise erfolgende Freisetzung von Enzymaktivitäten in das zellfreie Plasma unterbunden wird. Diese Frage soll in einer folgenden Untersuchungsreihe noch geklärt werden.

Die Enzymaktivitätsbestimmungen an Thrombozyten beim gleichen Probanden an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen zeigten für die LDH und PGK keine statistisch signifikanten Unterschiede. Bei der PK- und GAPDH-bestimmung ergab sich jedoch eine statistische Auffälligkeit. Dies könnte einerseits an den oben geschilderten technischen Gründen der Thrombozytenabtrennung liegen. Diese Unterschiede sind aber nicht als sehr bedeutsam anzusehen, da sie sich jeweils nur in einer der beiden Varianzanalysen nachweisen lassen.

Auch hier ergaben sich jedoch gegenüber den früheren Befunden von OHLER (11) an einem kleineren Probandengut keine wesentlichen Unterschiede im Gesamtergebnis.

Die vorgelegten Untersuchungsergebnisse zeigen demnach an, daß die von OHLER (11) inaugurierte Methode der Intrathrombozytären Enzymbestimmungen im Thrombozytenreichen Plasma Ergebnisse liefert, die hinreichend gut reproduzierbar, für

die klinische Diagnostik enzymopenischer Zustände in Thrombozyten brauchbar sind. Dies wird u.a. durch die von OHLER (13) festgestellten Enzymdefekten bei der Thrombozytopathie Glanzmann erhärtet, die entsprechend den Befunden von LÖHR und Mitarbeitern (8) deutlich unterhalb der Normwerte, außerhalb der 2-Sigma-Zone liegen.

Z u s a m m e n f a s s u n g :

1. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der "Plasmasubstraktionsmethode" die Fermente Laktatdehydrogenase, Pyruvatkinase, Glycerinaldehyd-3-Phosphodehydrogenase und 3-Phosphoglycerat-1-Kinase in Thrombozyten bestimmt.
2. Die dabei erhaltenen Werte weichen nicht wesentlich von den früheren, an einem kleineren Probandengut gewonnenen Ergebnissen von OHLER (11) ab, unterscheiden sich jedoch von den an isolierten Thrombozyten ermittelten Resultaten hinsichtlich ihrer absoluten Höhe.
3. Es konnte weiter nachgewiesen werden, daß die Höhe der intrathrombozytären Enzymaktivitäten durch Nahrungsaufnahme nicht beeinflußt wird, wenn man von den technischen Problemen der Plasmatrübung absieht.
4. Die Meßwerte zweier verschiedener Untersucher am gleichen thrombozytenreichem Plasma waren praktisch identisch.
5. Bei der Bestimmung der intrathrombozytären Enzyme eines Probanden an aufeinanderfolgenden Tagen konnten statistisch gesicherte Abweichungen zwischen den Personen gefunden werden, jedoch keine zwischen den Meßwiederholungen derselben Person.

6. In der Diskussion der Ergebnisse wird eine Modifikation der Aufbereitungstechnik des thrombozytenreichen Plasmas vorgeschlagen, die eine weitere Verbesserung der Genauigkeit intrathrombozytärer Enzymbestimmungen mit dem "Plasma-substraktionsverfahren" ermöglichen soll.

L i t e r a t u r

1. BEESE, J., W. FARR, E. GRÜNER u. R.J. HASCHEN :
Klin.Wschr. 44 , 1049 (1969).
2. BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK,
K.H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER :
Diphosphofructo-Aldolase, Phosphoglyceraldehyddehydro-
genase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-
dehydrogenase und Pyruvatkinase in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 86 , 555 (1953).
3. BLUM, K.H.
Thrombastenie Glanzmann- ein biochemisch definiertes
Krankheitsbild. Med.Klinik 62 , 1189 (1967).
4. BREDDIN, K., W. FRITZSCHE und W. SPIELMANN:
Zur Frage der Thrombozytenkonservierung. Klin.Wschr.
42 , 180 (1964).
5. DELBRÜCK, A., E. ZEBE und Th. BÜCHER :
Über die Verteilungsmuster von Enzymen des energie-
liefernden Stoffwechsel in Flugmuskel, Sprungmuskel
und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cyto-
logische Zuordnung. Biochem.Z. 331 , 273 (1959).
6. FEISSLY, R. und H. LÜDIN :
Thrombozytenzählung. Literatur in : J.JÜRGENS und
F.K. KELLER: Klinische Methoden der Blutgerinnungs-
analysen S. 127 , Stuttgart , 1959.
7. KUBOWITZ, F. und P. OTT :
Isolierung und Kristallisation eines Gärungsfermentes
aus Tumoren. Biochem. Z. 314 , 94 (1943).
8. LÖHR, G.W., H.D. WALLER und R. GROSS :
Beziehung zwischen Plättchenstoffwechsel und Retraktion
des Blutgerinnsels unter besonderer Berücksichtigung der
Thrombozytopathie GLANZMANN-NAEGLI.
Dtsch.med.Wschr. 86 , 879 , 946 (1961).

9. LÖHR, G.W. und H.D. WALLER :
Eine neue enzymopenische hämolytische Anämie mit
Glutathionreduktase-Mangel. Med.Klin. 57 , 1521 (1962).
10. LÖHR, G.W. In :
Stoffwechsel und Membranpermeabilität von
Erythrozyten und Thrombozyten. S. 196 , Stuttgart , (1968).
11. OHLER, W.G.A. :
Die Verwendung thrombozytenreichen Plasmas zur Be-
stimmung intrathrombozytärer Enzyme.
Therapiewoche 18 , 47 , 2115 (1968).
12. OHLER, W.G.A. :
Ergebnisse und Bedeutung von Enzymbestimmungen an
Thrombozyten. Klin.Wschr. 46 , 737 (1968).
13. OHLER, W.G.A. :
Vth Congress of the Asian and Pacific Society
of Haematology. Istanbul 1969.
14. RAMOT, B., A. SZEINBERG, A. ADAM, C. SHEBA and D. GAFNI :
A study of subjects with erythrocyte glucos-6-phosphate
dehydrogenase deficiency: Investigation of platelet
enzymes. J.clin.Invest. 38 , 1659 (1959).
15. VOGELL , W., F.R. BISHAI , Th. BÜCHER, M.KLINGENBERG,
D.PETTE und E.ZEBE :
Über strukturelle und enzymatische Muster in Muskeln
von Locusta migratoria . Biochem. Z. 332 , 81 (1959).
16. WALLER, H.D. und GROSS, R. :
Genetische Enzymdefekte als Ursache von Thrombozytopatien.
Verh.Kongr.inn.Med. 70 ; 476 (1964).
17. WALLER, H.D. :
Persönliche Mitteilung an W.G.A. OHLER 1966.
18. WALLER, H.D., LÖHR, G.W., GRIGNANI, F, u. GROSS, R. :
Über den Energiestoffwechsel normaler menschlicher
Thrombozyten. Trombos.Diathes.haemorrh. (Stuttgart)
3 : 520 (1959).
19. WEBER, E. :
Grundriß der biologischen Statistik, 6. Aufl.Fischer,
Stuttgart 1967.

Person	LDH	PK	PGK	GAPDH
Ca. (männl.)	158	134	99	116
Pl. (weibl.)	195	145	115	113
Sc. (männl.)	188	152	120	102
Le. (weibl.)	200	178	143	102
Hu. (männl.)	172	108	83	125
Sa. (männl.)	134	135	107	94
Se. (weibl.)	218	107	146	182
Br. (weibl.)	163	137	112	138
Wa. (männl.)	192	139	98	134
Fr. (weibl.)	198	134	128	147
Er. (weibl.)	152	122	122	133
Bi. (weibl.)	153	136	113	115
Be. (männl.)	169	151	111	131
v.B. (männl.)	132	127	105	118
Kn. (weibl.)	137	104	118	127
Ri. (weibl.)	157	117	98	89
He. (weibl.)	151	148	98	102
Fr. (männl.)	214	176	142	179
He. (männl.)	179	124	124	139
Ha. (männl.)	144	173	121	87
Ma. (weibl.)	169	133	122	160
Le. (weibl.)	181	121	129	155
Um. (männl.)	162	130	98	118
Sch. (männl.)	162	125	111	125
Di. (männl.)	152	137	97	118
Di. (weibl.)	175	164	113	135
Ne. (männl.)	142	127	108	137
Fr. (männl.)	199	196	135	189
Dü. (männl.)	145	127	110	141
Ka. (weibl.)	194	163	128	176
Be. (männl.)	167	156	113	150

T a b e l l e 4 : Bestimmung der Enzymaktivitäten von vier intrathrombozytären Fermenten bei 31 Probanden in 10^{11} Thrombozyten

Person	IDH	PK	PGK	GAPDH
Ca. (männl.)	158	134	99	116
	173	143	108	116
	166	131	97	112
Pi. (weibl.)	195	145	115	113
	210	160	137	153
	137	152	131	121
Sc. (männl.)	188	152	120	102
	168	150	118	115
	172	156	112	107
Le. (weibl.)	200	178	143	102
	195	174	130	116
	178	164	125	115
Hu. (männl.)	172	108	83	125
	168	126	97	90
	134	123	93	63
Sc. (männl.)	134	135	107	94
	212	106	107	138
	155	139	109	131
Se. (weibl.)	218	107	146	182
	207	103	148	182
	243	116	149	174
Br. (weibl.)	163	137	112	138
	184	143	117	147
	167	149	127	149
Wa. (männl.)	192	139	98	134
	214	153	140	118
	168	152	106	131
Fr. (weibl.)	198	134	128	147
	182	134	117	128
	203	142	126	154
Er. (weibl.)	152	122	122	133
	154	132	118	131
	166	145	122	144
Bi. (weibl.)	153	136	113	115
	147	141	110	131
	165	143	113	123
Be. (männl.)	169	151	111	131
	168	162	117	132
	188	177	125	139
v.B. (männl.)	132	127	105	118
	124	120	105	122
	123	132	106	122

Tabelle 5 : Bestimmungen der Thrombozytenfermente
an drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Person	LDH	PK	PGK	GAPDH	(IE/10 ¹¹ Thrombozyten)
Kn. (weibl.)	137	104	118	127	
	146	131	119	159	
	136	145	112	151	
	151	112	125	165	
Ri. (weibl.)	157	117	98	89	
	169	121	118	116	
	139	110	100	98	
	150	107	115	127	
He. (weibl.)	151	148	98	102	
	120	95	87	117	
	149	110	99	138	
	142	118	93	112	
Fr. (männl.)	214	176	142	179	
	191	171	130	159	
	200	181	138	171	
	183	184	147	202	
He. (männl.)	179	124	124	139	
	209	121	121	134	
	180	159	119	137	
	232	146	144	187	
Ha. (männl.)	144	173	121	87	
	138	179	129	85	
	169	177	108	84	
	205	177	112	94	
Ma. (weibl.)	169	133	122	160	
	170	154	114	167	
	177	157	119	153	
	188	156	133	170	

Tabelle 6 : Bestimmungen der Thrombozytenfermente an vier aufeinanderfolgenden Tagen.

Perment	Beteiligte Einflußgrößen	Anzahl der Freiheitsgrade	Summe der Abweichungsquadrate	Mittleres Abweichungsquadrat	F	p
LDH	Personen Tage Rest Total	6 3 18 27	14 215. 35 714 1 142. 10 714 5 585. 64 286 20 940. 10 714	2 369. 22 619 380. 70 258 310. 24 683	7,63 1,23	<0,01 >0,05
PK	Personen Tage Rest Total	6 3 18 27	17 266. 92 857 411. 57 143 3 729. 92 851 21 408. 42 857	2 877. 82 143 137. 19 048 207. 21 825	13,88 0,66	<0,01 >0,05
PGK	Personen Tage Rest Total	6 3 18 27	4 872. 71 429 411. 82 143 1 088. 42 857 6 372. 96 429	812. 11 905 137. 27 381 60. 46 825	13,43 2,27	<0,01 >0,05
GAPDH	Personen Tage Rest Total	6 3 18 27	25 388. 71 429 2 344. 39 286 3 199. 85 714 30 932. 96 429	4 231. 45 238 781. 46 429 177. 76 984	23,80 4,34	<0,01 <0,05

Varianzanalyse tabelle I

Perment	Beteiligte Einflußgrößen	Anzahl der Freiheitsgrade	Summe der Abweichungsquadrate	Mittleres Abweichungsquadrat	F	P
LDH	Personen	13	20 135. 64 286	1 548. 89 560	4,11	<0,01
	Tage	2	716. 33 333	358. 16 667	0,95	>0,05
	Rest	26	9 803. 00 000	377. 03 846		
	Total	41	30 654. 97 616			
PK	Personen	13	11 451. 16 667	880. 85 897	13,58	<0,01
	Tage	2	492. 76 190	246. 38 095	3,79	<0,05
	Rest	26	1 685. 90 476	64. 84 249		
	Total	41	13 629. 83 333			
PGK	Personen	13	7 607. 90 476	585. 22 344	8,55	<0,01
	Tage	2	161. 76 190	80. 88 095	1,18	>0,05
	Rest	26	1 780. 23 810	68. 47 070		
	Total	41	9 549. 90 476			
GAPDH	Personen	13	16 434. 47 619	1 264. 19 048	6,72	<0,01
	Tage	2	170. 04 762	85. 02 381	0,45	>0,05
	Rest	26	4 887. 95 238	187. 99 817		
	Total	41	21 492. 47 619			

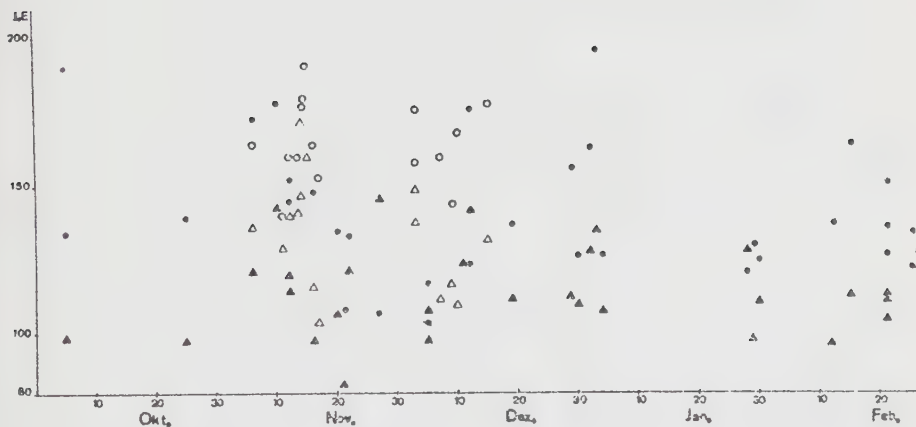


Abb. 6 Graphische Darstellung der Messergebnisse der Enzymaktivitäten von PK und PGK von OHLER (PGK Δ , PKO gemessen 1965) und Leonhardt (PGK Δ , PK $\bullet$ gemessen 1967/68) in 10^9 Thrombozyten.

Lebenslauf

Am 14. August 1938 wurde ich als zweite Tochter der Eheleute Paul und Elsa Leonhardt, geb. Marquardt in Magdeburg geboren. Von 1944 - 1952 besuchte ich die Grundschule; von 1952 - 1954 die Otto von Guericke Oberschule in Magdeburg. Nach der Übersiedlung im Jahre 1954 von Magdeburg nach Frankfurt am Main besuchte ich dort das Bettina-Realgymnasium und legte 1958 die Reifeprüfung ab. Von 1958 - 1965 studierte ich an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität in Frankfurt am Main Medizin und bestand im Wintersemester 1965/1966 das medizinische Staatsexamen. Während der Medizinalassistentenzeit arbeitete ich u.a. 1967/1968 an der I. Medizinischen Universitätsklinik in Mainz. Nach der Approbation im Januar 1969 begann ich in der Neurologischen Abteilung der Bundesknappschaftsklinik Sulzbach/Saar zu arbeiten mit der Absicht, Fachärztin für Neurologie und Psychiatrie zu werden. Seit Februar 1972 bin ich an der Abteilung für Neuroradiologie in der Universitätsnervenklinik in Homburg/Saar tätig. Ich bin seit 1969 verheiratet und Mutter eines Sohnes.

